arrhoea virus (BVDV) in field samples / U.I. Laamanen, E.P. Neuvonen, E.M. Yliviuhkola, P.M.-L. Veijalainen // Res. Vet. Sci. 1997. V. 63, N3. P. 199-203.
5. Role of bovine viral diarrhoea virus biotype in the establishment of fetal infections / M.J. Harding, X. Cao, H. Shams [et al.] // Am. J. Vet. Res. 2002. Vol.63, №10. P. 1455-1463.
6. Togaviridae / J.S. Porterfield, J. Casals, M.P. Chumakov [et al.] // Intervirology 1978. Vol.9. P. 129-148.

УДК 619:578.825.1:573.6.086.83:57.083.3.001.8
Е.А. Яснева, А.В. Константинов

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОСТАНОВКИ НЕПРЯМОГО ВАРИАНТА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ НА ШТАММЫ «ВК» И «К» ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ СВИНЕЙ

Введение

Болезнь Ауески (БА), вызываемая вирусом семейства Herpesviridae рода Varicellavirus, продолжает оставаться одной из самых серьезных проблем для свиноводства многих стран мира [2].

Широкомасштабная вакцинация свиней против болезни Ауески, которая используется для профилактики заболевания, несмотря на значительный клинический эффект, не может препятствовать инфицированию животных, т.к. особенностью возбудителя болезни Ауески является способность вызывать латентную инфекцию, при которой вирус может пожизненно персистировать в клетках ЦНС, миндалин и лимфоузлов. Вирусный геном интегрируется в геноме клетки хозяина и при определенных обстоятельствах способен реактивироваться и инициировать новый цикл размножения вируса, провоцируя возникновение заболевания, выделение вируса во внешнюю среду, инфицируя при этом чувствительных животных [8].

В большинстве развитых стран мира программы искоренения БА основаны на применении «маркированных вакцин» и соответствующих диагностических тест-систем, способных дифференцировать инфицированных животных среди вакцинированного поголовья с последующей их выбраковкой. В настоящее время в качестве таких дискриминирующих тестов используется система на основе блокирующего иммуноферментного анализа с применением моноклональных антител, как правило, зарубежного производства («Laboratories HIPRA», Испания, «Chekit –ИФА», фирма Bommeli-IDEXX) [1, 4].

Метод иммуноферментного анализа находится в постоянном развитии. С одной стороны, расширяется число объектов исследования, с другой – углубляются и совершенствуются методы самого анализа. Это приводит к тому, что упрощается схема анализа, сокращается время его проведения, уменьшается расход реагентов (6). Иммуноферментный метод обладает рядом преимуществ перед традиционными иммунологическими реакциями, главными из которых является высокая чувствительность, специфичность, возможность получения количественных данных, автоматизации всех этапов постановки анализа и воспроизводимость. Как и всякий аналитический метод, ИФА кроме достоинств имеет и свои недостатки, прежде всего связанные с фоновыми реакциями, которые становятся все более значимыми по мере того, как растет чувствительность детекторных систем.

Целью нашей работы была оптимизация условий постановки непрямого варианта иммуноферментного анализа за счет усовершенствования метода получения антигена вируса болезни Ауески, который может быть использован в ИФА в качестве штамм – специфического при выявлении антител к gE антигену в сыворотке крови, без использования моноклональных антител, а также снижения неспецифической сорбции конъюгата на иммунный и неспецифический комплекс антиген-антитело, который ярко выражен у сывороток кро-

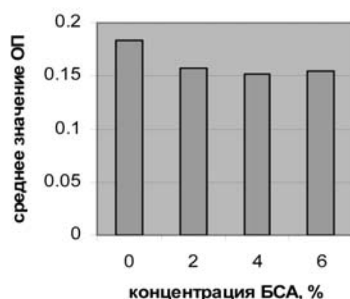


Рис. 1. Зависимость ОП нормальной сыворотки от концентрации БСА в буферном растворе

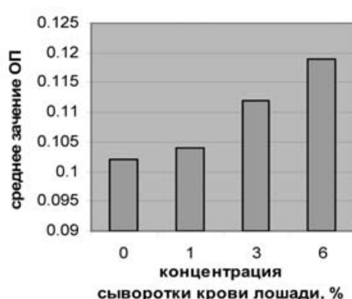


Рис. 2. Зависимость ОП отрицательного контроля от концентрации сыворотки крови лошади в буферном растворе

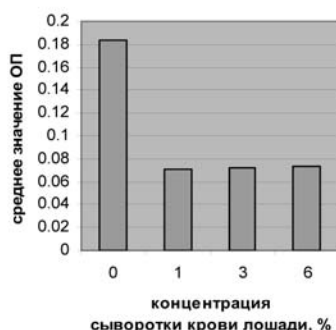


Рис. 4. Зависимость ОП отрицательного контроля от концентрации сыворотки крови лошади в буферном растворе для разведения конъюгата

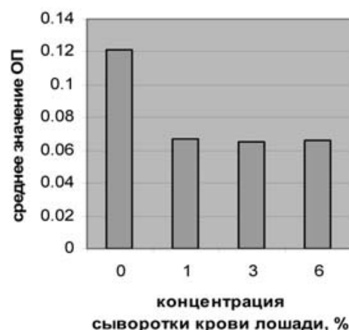


Рис. 3. Зависимость ОП отрицательного контроля от концентрации сыворотки крови лошади в буферном растворе для разведения сывороток и конъюгата

ви свиней с низкой активностью, что дает возможность дифференцировать латентно-инфицированных животных среди свиней, вакцинированных «маркированной» вакциной против болезни Ауески.

Материалы и методы

Антиген. В работе использовали концентрированный и очищенный культуральный антиген вируса болезни Ауески штамм «ВК».

Сыворотки. Применяли гипериммунные сыворотки крови свиней на штаммы «ВК» и «К» вируса БА, а также Ig G кроликов на данные штаммы, и нормальные сыворотки крови, не содержащие антител к данному заболеванию.

Конъюгат антивидовых антител. Использовали коммерческий конъюгат антисвиных и антикроличьих антител, меченных пероксидазой хрена («Sigma»).

Непрямой вариант ИФА. Определение активности полученного антигена в ИФА осуществляли по общепринятой методике. Иммобилизацию 96-луночных полистироловых планшетов (Nunc, Immunoplate, Дания) антигеном в разведениях 1:1000, 1:10000, 1:100000 и 1:1000000 проводили в объеме 100 мкл на лунку в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буферном растворе (рН-9,6) в течение 18 ч при температуре 4° С. Для блокирования остаточных свободных центров связывания в лунках планшета, с которыми могут взаимодействовать любые последующие компоненты реакции, использовали 10% раствор сыворотки крови лошади на трис-HCl буферном растворе с добавлением 0,1% твин – 20 (ТБР-Т), рН-7,4. Сыворотки крови свиней на штаммы «ВК» и «К» вируса болезни Ауески и Ig кроликов, а также нормальные сыворотки вносили по 100 мкл в лунку в разведении 1:500 и 1:1000 соответственно, и инкубировали при 37° С 1 ч. Образовавшийся комплекс антиген-антитело вы-

являли добавлением конъюгата антисвиных и антикроличьих антител, меченных пероксидазой хрена, в разведении 1:3500 и 1:3000 соответственно. Планшеты инкубировали при температуре 37° С в течение 1 ч. Между этапами реакции несвязавшиеся компоненты удаляли путем промывания лунок планшета 3-4 раза промывочным буфером. Индикацию реакции проводили с помощью субстрата ОФД в 0,05 М фосфатно-цитратном буферном растворе (рН-5,0) с добавлением 0,02% перекиси водорода. Через 10 мин реакцию останавливали добавлением в лунки планшетов по 50 мкл 10%-й серной кислоты. Значения оптической плотности измеряли при длине волны 492 нм на спектрофотометре-ридере (ИФА-ОЭП).

Результаты и обсуждение

Для очистки вируса болезни Ауески от антигенов культуральных сред преимущественно применяют методы переосаждения полиэтиленгликолем с молекулярной массой 115 и 6000, обработки органическими растворителями – хлороформом, метиленхлоридом, фреоном – 113, детергентами – дезоксихолатом натрия, тритоном Х-100 и Nonidet P-40, ультрафильтрации, дифференциального центрифугирования и центрифугирования в градиентах плотности сахарозы и хлористого цезия [3,9]. Недостатком перечисленных методов и их общепринятых сочетаний являются низкая степень очистки получаемого антигена, большие его потери и низкая способность дифференцировать инфицированных животных среди вакцинированных.

Нами были подобраны оптимальные условия для получения высокоочищенного и высококонцентрированного антигена вируса болезни Ауески, которые заключались в дифференциальном центрифугировании, осаждении ПЭГ – 6000, очистке ультрацентрифугированием через 20% сахарозу с использованием неионного детергента твин-20, который способствует диссоциации комплексов балластных белков с вирусными структурами и отделению компонентов вирусных частиц, вследствие чего повышается дифференцирующая способность полученного антигена.

Для концентрирования и очистки антигена использовали культуральный вирус болезни Ауески, полученный по общепринятой методике с незначительными модификациями [7].

Вируссодержащую суспензию осветляли на центрифуге JANETZKI K70 при 1000 об/мин в течение 15 мин. К полученной надосадочной жидкости добавляли NaCl до 0,5 М и ПЭГ – 6000 до 10% к объему, интенсивно перемешивали и инкубировали 18 ч при 4-8° С. Затем отделяли образовавшийся осадок центрифугированием при 3500 об/мин в течение 80 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 0,15 М NaCl с 0,02 М натрий фосфатным буферным раствором с добавлением 0,2% неионного детергента твин-20 (ЗФРТ, рН 7,4) в объеме 1/100 от исходного объема суспензии и центрифугировали 30 мин при 3000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость – первый элюат – отбирали, а осадок ресуспендировали в ЗФРТ 1/100 от исходного объема и центрифугировали в том же режиме. Собирали надосадочную жидкость – второй элюат, а осадок ресуспендировали и центрифугировали, получая третий элюат. Второй и третий элюаты объединяли и очищали методом центрифугирования через 20% сахарозу, приготовленную на ЗФРТ при 20000 об/мин в течение 30 мин. Полученный осадок, продукт очистки, суспендировали в ЗФР и использовали в качестве антигена, активность которого определяли в непрямом варианте иммуноферментного анализа с использованием Ig G кроликов и сывороток крови свиней. Результаты проведенных исследований представлены в таблице.

Как видно из таблицы полученный антиген обладал высокой специфической

Таблица

Активность антигена вируса болезни Ауески штамм «ВК» в непрямом варианте иммуноферментного анализа.

Разведения антигена	Оптическая плотность					
	Ig G кроликов			сыворотки крови свиней		
	«ВК»	«К»	отриц.	«ВК»	«К»	отриц.
1:1000	2.027	0.845	0.138	1.479	0.385	0.251
1:10000	1.050	0.192	0.087	1.078	0.230	0.158
1:100000	0.551	0.094	0.082	0.383	0.152	0.130
1:1000000	0.435	0.076	0.078	0.278	0.144	0.117

активностью, которая составляла более 1:1000000. При этом значения оптической плотности (ОП) составили 0.435 для IgG кролика и 0.278 для сыворотки крови свиней по гомологичному штамму, а по гетерологичному – 0.076 и 0.144 соответственно. В дальнейших исследованиях использовали в качестве рабочего разведения антиген в разведении 1:10000, т.к. в такой концентрации наблюдали оптимальную разницу между значениями ОП сывороток по штамму «ВК» и «К», которые составили 1.050 и 0.192 для IgG кролика, 1.078 и 0.230 для сыворотки крови свиней, соответственно. Использование антигена в данной концентрации способствовало также его более высокой специфичности и возможности выявления антител в сыворотках крови с низкой активностью [5]. Таким образом, указанным методом показана способность полученного антигена дифференцировать штамм «ВК» и «К» вируса болезни Ауески по показаниям оптической плотности в непрямом варианте иммуноферментного анализа при исследовании сывороток крови свиней и кроликов.

Чтобы исключить неспецифическую реакцию – сорбцию конъюгата на иммунный и неспецифический комплекс антиген-антитело, нами в дальнейшем были проведены исследования по уменьшению фоновых «помех» при использовании БСА в концентрации 2, 4, 6% и сыворотки крови лошади в концентрации 1, 3, 6% в буфере для разведения сывороток крови свиней и конъюгата (ТБР-Т).

В результате проведенного непрямого варианта иммуноферментного анализа установлено, что среднее значение ОП отрицательной сыворотки без БСА составляло 0.183, с применением 2% БСА – 0.157, 4% – 0.152, 6% – 0.155 (рис.1). Таким образом, применение БСА не оказывало значительного влияния на снижение оптической плотности раствора в лунках с отрицательными пробами сыворотки крови свиней, т.е. не снижало фоновые реакции.

Применение сыворотки крови лошади в буфере для разведения сывороток крови свиней не уменьшало неспецифическую сорбцию, а наоборот даже увеличивало фоновые реакции (рис. 2). Но применение сыворотки крови лошади в буферном растворе для разведения конъюгата, а также совместно конъюгата и сывороток уменьшало фоновые «помехи», что показано на рис. 3 и 4, из которых видно, что среднее значение ОП нормальной сыворотки крови свиней уменьшилось в 2 раза по сравнению с ОП без применения лошадиной сыворотки. При этом титры стандартных гипериммунных сывороток крови свиней на штаммы «ВК» и «К» вируса болезни Ауески не изменялись и составляли 1:1600 и 1:200, соответственно, что свидетельствовало о дифференцирующей способности применяемого непрямого варианта иммуноферментного анализа.

Выводы

В результате проведенных исследований установлено, что применение усовершенствованного метода получения антигена вируса болезни Ауески позволяет использовать его в качестве штамм-специфического при выявлении антител к gE антигену в сыворотках крови в реакции непрямого иммуноферментного анализа без использования моноклональных антител. Кроме того, определено, что уменьшение неспецифической сорбции конъюгата на иммунный и неспецифический комплекс антиген-антитело, и вследствие этого снижение фонового уровня при проведении непрямого варианта иммуноферментного анализа возможно при добавлении 1-3 % сыворотки крови лошади в буферный раствор для разведения исследуемых сывороток крови свиней и конъюгата. Применение для этих целей БСА и сыворотки крови лошади только в буфере для разведения сывороток является неэффективным, т.к. они не оказывают влияния на фоновые реакции или способствуют их повышению.

РЕЗЮМЕ

Статья посвящена оптимизации условий постановки непрямого варианта иммуноферментного анализа в результате усовершенствования метода получения антигена вируса болезни Ауески и использования различных концентраций бычьего сывороточного альбумина (БСА) и сыворотки крови лошади в буферном растворе для разведений исследуемых сывороток и конъюгата с целью уменьшения фоновых реакций.

SUMMARY

The paper deals with the optimization of conditions for indirect ELISA resulting from the improvement of the method for Aujeszky's disease virus antigen preparation and the usage of different concentrations of bovine serum albumin and equine blood serum in buffer solution for test serum and conjugate dilutions to decrease background reactions.

Литература

1. Болезнь Ауески: дифференциация инфицированных и вакцинированных животных методом блокирующего ИФА на основе моноклональных антител / О.С. Моренков, Ю.А. Собко, В.А. Сергеев [и др.] // Вирусн. болезни с.-х. ж-ных: тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф. Владимир, 1995. С. 211.
2. Болезнь Ауески свиней. Современная эпизоотическая ситуация и меры борьбы / А.А. Коломыцев, И.В. Амирова, А.А. Стрижаков [и др.] // Ветеринарный консультант. 2007. №13. С.7-10.
3. Оценка эффективности различных методов концентрирования вируса болезни Ауески / Ж.Б. Кандыбаева, Л.В. Маликова, Б.Н. Хайруллин // Акт. пробл. вирус.: тез. докл. науч. конф. п. Гвардейский, 1994. Ч. 1. С.62.
4. Применение дифференцирующего ИФА при болезни Ауески свиней / О.П. Бъядовская, О.Г. Андреева, А.С. Оганесян [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. Владимир, 2006. Т. 4. С. 225–232.
5. Получение и оценка диагностических сывороток и иммуноглобулинов к вирусу болезни Ауески / Г.А. Блотова, В.И. Диев, А.В. Константинов [и др.] // Акт. пробл. инфекц. пат. ж-ных: мат. Междунар. науч. конф., посв. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». Владимир, 2003. С. 203–208.
5. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. М.: Высш. шк., 1991. 288 с.
6. Усовершенствование технологии изготовления вакцин против болезни Ауески из маркированного штамма «ВК» / Т.И. Корпусова, В.А. Мищенко, А.П. Пономарев [и др.] // Вет. патология
7. Экологические особенности вируса болезни Ауески / А.В. Мищенко, Н.А. Яременко, В.М. Захаров [и др.] // Болезнь Ауески свиней: сб. науч. работ. Владимир, 2001. С. 43–45.
8. Pseudorabies virus mutants, vaccines containing same, methods for the production of same and methods for the use same: US Patent № 4,711,850. Malon Kit, Saul Kit, p. 6-7.

УДК 619:616.98:579.843.96:636.4

Д.А. Бирюченков, В.С. Русалеев, А.А. Фроловцева

КЛИНИЧЕСКИЕ И ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АКТИНОБАЦИЛЛЕЗНОЙ ПЛЕВРОПНЕВМОНИИ СВИНЕЙ

Введение

Актинобациллезная плевропневмония свиней – инфекционное контагиозное заболевание свиней, характеризующееся септикотоксемией, геморрагической и гнойно-некротизирующей пневмонией, а также серозно-фибринозным плевритом, перикардитом и артритами. Заболевание вызывают бактерии семейства *Pasteurellaceae*, рода *Actinobacillus*, вида *A. pleuropneumoniae*. Заболеванию наиболее подвержены поросята 2-4-месячного возраста.

Данное заболевание свиней широко распространено в мире, особенно в странах с развитым свиноводством [2, 4]. В Российской Федерации болезнь была впервые диагностирована М. Сидоровым и М. Скородумовым в 1975 году [1, 9].

Возбудитель актинобациллезной плевропневмонии – гемофильные бактерии *Actinobacillus pleuropneumoniae* – мелкие (0,3-0,4х0,4-0,5 мкм), грамотрицательные, неподвижные палочки или коккобактерии. Спор не образуют. Вирулентные штаммы имеют капсулу. Обладают выраженным тропизмом к легочной ткани [1, 5].

Отсутствие общепризнанной методики определения вирулентности бактерий *Actinobacillus pleuropneumoniae* затрудняет работу по отбору патогенных штаммов, необходимых для изготовления инактивированных вакцинных препаратов против данного заболевания. Это обстоятельство побудило нас сопоставить различные методы экспериментального воспроизведения актинобациллезной плевропневмонии у поросят.

Из-за скудности информации в отечественной печати об этой инфекции практические ветеринарные специалисты мало знакомы с актинобациллезной плевропневмонией свиней, поэтому публикация материалов о ней вполне обоснована.

Материалы и методы

В работе использовали штамм *A. pleuropneumoniae* «Ш-1», хранящийся в лаборатории микробиологии ФГУ «ВНИИЗЖ». Бактериальную массу актинобацилл получали выращиванием в течение 16-18 часов на поверхности сывороточно-дрожжевого агара, приготовленного на основе бульона по Хоттингеру. Агаровую культуру возбудителя смывали стерильным фосфатно-буферным раствором с pH